



## PROJECT REPORT

THE EFFECTS OF AN INDIGENOUS CONTRACEPTIVE HERBAL  
FORMULATION ON THE GONADOTROPHS OF THE PITUITARY GLAND  
OF RAT (EXPERIMENTAL IMMUNOHISTOCHEMICAL RESEARCH)

Short Term Grant No. 304/PPSP/6131266

PRINCIPAL RESEARCHER :

DR MOHAMMED NAZRUL ISLAM  
LECTURER, DEPARTMENT OF ANATOMY, PPSP, USM

CO-RESEARCHERS :

PM DR SITI AMRAH SULAIMAN  
DEPARTMENT OF PHARMACOLOGY, PPSP, USM

PM DR MARINA YU KAPITONOVA,  
DEPARTMENT OF ANATOMY, PPSP, USM

PROF SYED MOHSIN S. JAMALULLAIL  
PPSK, USM

31st August, 2005

## PROJECT REPORT

THE EFFECTS OF AN INDIGENOUS CONTRACEPTIVE HERBAL  
FORMULATION ON THE GONADOTROPHS OF THE PITUITARY GLAND  
OF RAT (EXPERIMENTAL IMMUNOHISTOCHEMICAL RESEARCH)

Short Term Grant No. 304/PPSP/6131266

PRINCIPAL RESEARCHER :

DR MOHAMMED NAZRUL ISLAM  
LECTURER, DEPARTMENT OF ANATOMY, PPSP, USM

CO-RESEARCHERS :

PM DR SITI AMRAH SULAIMAN  
DEPARTMENT OF PHARMACOLOGY, PPSP, USM

PM DR MARINA YU KAPITONOVA,  
DEPARTMENT OF ANATOMY, PPSP, USM

PROF SYED MOHSIN S. JAMALULLAIL  
PPSK, USM

31st August, 2005

PUSAT PENGAJIAN SAINS TERBUATAN	
SALINAN :	
<input type="checkbox"/>	Dkt. Penyelidikan, PPSP
<input checked="" type="checkbox"/>	Persidangan Perubatan, USM/KK
<input type="checkbox"/>	RCMG
T/Tangan : ..... Tarikh : 9/10/05	

**BAHAGIAN PENYELIDIKAN & PEMBANGUNAN  
CANSELORI  
UNIVERSITI SAINS MALAYSIA**

Laporan Akhir Projek Penyelidikan Jangka Pendek

**Short Term Grant No. 304/PPSP/6131266**

- 1) Nama Penyelidik: DR MOHAMMED NAZRUL ISLAM  
LECTURER, DEPARTMENT OF ANATOMY, PPSP, USM

Nama Penyelidik-Penyelidik  
Lain (Jika berkaitan) :

PM DR SITI AMRAH SULAIMAN  
DEPARTMENT OF PHARMACOLOGY, PPSP, USM

PM DR MARINA YU KAPITONOVA,  
DEPARTMENT OF ANATOMY, PPSP, USM

PROF SYED MOHSIN S. JAMALULLAIL  
PPSK, USM

- 2) Pusat Pengajian/Pusat/Unit :

SCHOOL OF MEDICAL SCIENCES, USM

- 3) Tajuk Projek:

THE EFFECTS OF AN INDIGENOUS CONTRACEPTIVE HERBAL FORMULATION ON  
THE GONADOTROPHS OF THE PITUITARY GLAND OF RAT (EXPERIMENTAL  
IMMUNOHISTOCHEMICAL RESEARCH)

4) (a) Penemuan Projek/Abstrak

(Perlu disediakan maklumat di antara 100 – 200 perkataan di dalam Bahasa Malaysia dan Bahasa Inggeris. Ini kemudiannya akan dimuatkan ke dalam Laporan Tahunan Bahagian Penyelidikan & Pembangunan sebagai satu cara untuk menyampaikan dapatan projek tuan/puan kepada pihak Universiti).

**Introduction :** Traditional herbal contraceptives are widely used, however their mechanism of actions are yet to be evaluated. Previous studies showed that contraceptive herbal formulations ( *Lepidagathis longifolia*, *Paladium sp* and *Phyllagathis rotundifolia*) cause anovulatory estrous cycle, altered circulating hormone levels and fetal resorption in rats.

**Objective :** To observe the morphometric changes of the gonadotrophs and the plasma concentrations of follicle stimulating hormone and leutinizing hormone.

**Methodology :** Thirty five animals were randomly divided into 5 groups. Control animals were given vehicle and experimental animals were given combined herbal extract or individual herbal extract at a dose of 540 mg/kg/day s.c for 7 days. Immuno-stained gonadotrophs were studied by using image analyzer, FSH and LH serum concentrations were determined.

**Results :** The FSH and LH concentrations were low in animals that received combined herbal extract ( $p < 0.01$ ) . FSH concentration was noted to be significantly low in animals that received *P. rotundifolia* ( $p < 0.05$ ). The mean cell area and cell density of gonadotrophs of animals that received combined herbal extract were significantly low compared to control group ( $p < 0.05$ ).

**Discussion :** These findings were corresponded to our previous findings that the combined herbal extract reduced both estradiol and progesterone concentrations and the individual plant extracts reduced the estradiol concentration significantly but not the progesterone.

**Conclusion :** We concluded that the herbal extracts do affect the pituitary gonadotrophs and the circulating gonadotrophins. Further evaluation is needed to verify whether the effect was directly on the pituitary or through a higher centre such as the hypothalamus.

- (b) Senaraikan Kata Kunci yang digunakan di dalam abstrak:

Bahasa Malaysia

Ekstrak Herba  
Gonadotrof  
FSH  
LH  
Tikus betina  
Kitaran estrus

Bahasa Inggeris

Herbal extract  
gonadotroph  
FSH  
LH  
female rats,  
estrous cycle

5) Output Dan Faedah Projek

- (a) Penerbitan (termasuk laporan/kertas seminar)  
(Sila nyatakan jenis, tajuk, pengarang, tahun terbitan dan di mana telah diterbitkan/dibentangkan).

**Paper Presented :**

Effects of an indigenous contraceptive herbal formulation on the gonadotrophs of the pituitary gland of rat", 10<sup>th</sup> National Conference on Medical Sciences, Health Campus, Universiti sains Malaysia. Held on 21-22 May, 2005

**One Manuscript** is ready to be submitted to the Journal "BIOMEDICAL RESEARCH"

Published by – School of Biomedical Sciences, Charles Stuart University, NSW, Australia

- (b) Faedah-Faedah Lain Seperti Perkembangan Produk, Prospek Komersialisasi Dan Pendaftaran Paten.  
(Jika ada dan jika perlu, sila guna kertas berasingan)

The results of the study explained the mechanism of action of the Herbal formulation used for contraception and provide the scientific background to produce the contraceptive products in commercial basis.

- (c) Latihan Gunatenaga Manusia

- i) Pelajar Siswazah:

Nil

- ii) Pelajar Prasiswazah:

Nil

- iii) Lain-Lain :

This study has been included as a part of the PhD thesis ( 2004 ) of PM Dr Siti Amrah Sulaiman entitled "Kajian mengenai profil kontraseptif sediaan herba tradisional Orang Asli Kaum Temuan"

6. Peralatan Yang Telah Dibeli:

Nil

---

UNTUK KEGUNAAN JAWATANKUASA PENYELIDIKAN UNIVERSITI

Daftar penyelidikan yang sudah.  
Bekas perakit dapat di hentikan

T/TANGAN Pengerusi  
J/K Penyelidikan  
Pusat Pengajian

  
PROFESSOR ABDUL AZIZ BABA  
Chairman of Research & Ethics Committee  
School of Medical Sciences  
Health Campus  
Universiti Sains Malaysia  
16150 Kubang Kerian, Kelantan

# **COMPREHENSIVE REPORT**



# **COMPREHENSIVE REPORT**

LAPURAN PENYELIDIKAN GERAN JANGKA  
PENDEK UNIVERSITI SAINS MALAYSIA

THE EFFECTS OF INDIGENOUS CONTRACEPTIVE  
HERBAL FORMULATION ON THE GONADOTROPHS OF  
THE PITUITARY GLAND OF RATS (EXPERIMENTAL  
IMMUNOHISTOCHEMICAL RESEARCH)

[KESAN HERBA KONTRASEPTIF MASYARAKAT ORANG  
ASLI TERHADAP GONADOTROF KELENJAR PITUITARI  
TIKUS (KAJIAN IMUNOHISTOKIMIA)]

PENYELIDIK UTAMA	:	DR. MOHAMMED NAZRUL ISLAM JAB. ANATOMI, PPSP
PENYELIDIK BERSAMA	:	PM SITI AMRAH SULAIMAN JAB. FARMAKOLOGI, PPSP  PM MARINA YU KAPITONOVA JABATAN ANATOMI, PPSP  PROF SYED MOHSIN S. JAMALULLAIL PPSK
NO. GERAN PENYELIDIKAN	:	304/PPSP/6131266
AMAUN GERAN	:	RM 17,889.00
JANGKAMASA PENYELIDIKAN	:	Mac 2003- Feb 2005

LAPURAN PENYELIDIKAN GERAN JANGKA  
PENDEK UNIVERSITI SAINS MALAYSIA

THE EFFECTS OF INDIGENOUS CONTRACEPTIVE  
HERBAL FORMULATION ON THE GONADOTROPHS OF  
THE PITUITARY GLAND OF RATS (EXPERIMENTAL  
IMMUNOHISTOCHEMICAL RESEARCH)

[KESAN HERBA KONTRASEPTIF MASYARAKAT ORANG  
ASLI TERHADAP GONADOTROF KELENJAR PITUITARI  
TIKUS (KAJIAN IMUNOHISTOKIMIA)]

PENYELIDIK UTAMA	:	DR. MOHAMMED NAZRUL ISLAM JAB. ANATOMI, PPSP
PENYELIDIK BERSAMA	:	PM SITI AMRAH SULAIMAN JAB. FARMAKOLOGI, PPSP  PM MARINA YU KAPITONOVA JABATAN ANATOMI, PPSP  PROF SYED MOHSIN S. JAMALULLAIL PPSK
NO. GERAN PENYELIDIKAN	:	304/PPSP/6131266
AMAUN GERAN	:	RM 17,889.00
JANGKAMASA PENYELIDIKAN	:	Mac 2003- Feb 2005

KESAN HERBA KONTRASEPTIF MASYARAKAT ORANG ASLI TERHADAP  
GONADOTROF KELENJAR PITUITARI TIKUS  
(KAJIAN IMUNOHISTOKIMIA)

ABSTRAK

OBJEKTIF

Kajian dijalankan untuk mengetahui kesan ekstrak herba kontraseptif Masyarakat Orang Asli Kaum Temuan terhadap gonadotrof (follikulotrof dan luteotrof) kelenjar pituitari serta kepekatan hormon FSH dan LH tikus.

BAHAN DAN KAEDAH

Tikus dara diberi rawatan ekstrak herba campuran serta masing-masing ekstrak kontraseptif selama tujuh (7) hari berturut-turut dan dikorbankan semasa fasa diestrus. Berat badan dicatatkan sebelum dan diakhir kajian. Smear vagina dan keadaan klinikal tikus diperhatikan setiap pagi. Kepekatan serum FSH dan LH ditentukan menggunakan kaedah asai radioimmun (RIA). Kelenjar pituitari ditimbang berat basahanya, dihiris setebal 4  $\mu$ m dan diwarnai dengan kaedah kompleks-enzim-avidin-biotin (ABC). Purata kawasan sel, kepadatan isipadu dan kepadatan sel follikulotrof dan luteotrof ditentukan dengan bantuan mikroskop dan penganalisis imejan.

KEPUTUSAN

Semua tikus berada dalam keadaan memuaskan dan aktif sepanjang tempoh kajian dijalankan. Tikus yang menerima ekstrak herba campuran (EP123) paling banyak mengalami penurunan berat badan, 7.65(8.07)%, diikuti tikus yang menerima ekstrak *Phyllagathis rodundifolia* (EP3), 6.38(8.94)%. Tikus yang menerima *Lepidagathis longifolia* (EP1) dan *Palaquium sp.* (EP2) masing-masing mengalami penurunan berat badan anggaran 2% manakala tikus kawalan mengalami peningkatan berat badan sebanyak

4.98(4.82)%. Tikus kumpulan kawalan mengalami pusingan estrus normal 4-6 hari manakala tikus yang menerima ekstrak mengalami pemanjangan fasa diestrus serta tanpa ovulasi. Kepekatan FSH rendah pada tikus yang menerima ekstrak. Nilai FSH tikus yang menerima herba campuran dan *P. longifolia* masing-masing berbeza dengan signifikan berbanding tikus kawalan ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ , M-WU). Kepekatan LH tikus yang menerima ekstrak herba campuran didapati rendah dan berbeza dengan signifikan berbanding tikus kawalan dan tikus yang menerima *L. longifolia* serta *P. rotundifolia*. Tikus yang menerima EP123 dan EP3 mempunyai purata kawasan sel dan kepadatan isipadu sel yang rendah, dan berbeza dengan signifikan berbanding Kumpulan kawalan (masing-masing  $p < 0.05$ , M-WU). Perubahan parameter yang berlaku pada sel luteotrof tidak berbeza dengan signifikan berbanding Kumpulan kawalan ( $p > 0.05$ , M-WU).

## PERBINCANGAN

Penemuan dalam kajian ini mencadangkan ekstrak herba campuran dan masing-masing ekstrak memberi kesan terhadap gondotrof kelenjar pituitari. Kesannya dalam mengurangkan purata kawasan sel dan kepadatan isipadu follikulotrof tikus yang menerima herba campuran dan *P. Rotunifolia* selari dengan penemuan pengurangan penghasilan FSH pada tikus yang menerima kedua ekstrak ini. Perubahan parameter luteotrof pada tikus yang menerima herba campuran dan *P. Rotundifolia*, walaupun tidak berbeza dengan signifikan menyokong kesan penurunan kepekatan LH pada tikus yang menerima EP123 dan peningkatan pada tikus yang menerima EP3. Samada kesan ini terus terhadap kelenjar ini atau melalui hipotalamus ia memerlukan kajian lebih lanjut.

## KESIMPULAN

Herba kontraseptif mempunyai kesan terhadap sel follikulotrof serta luteotrof dan seterusnya mempengaruhi kepekatan FSH dan LH tikus

KESAN HERBA KONTRASEPTIF MASYARAKAT ORANG ASLI TERHADAP  
GONADOTROF KELENJAR PITUITARI TIKUS  
(KAJIAN IMUNO-HISTOKIMIA)

1. PENDAHULUAN

Kewujudan berbagai jenis kontraseptif moden pada hari ini masih belum dapat memenuhi keperluan sebahagian masyarakat di Malaysia mahupun di negara asing. Penggunaan kontraseptif tradisional, walaupun tidak diikhtaf oleh Kementerian Kesihatan sesebuah negara masih terus diamalkan (Rita, *et al.*, 1998; Ngin & Chor-Swang, 1985; Roziah, 1999; Mukherjee, *et al.*, 1999; Anita, *et al.*, 2004). Perkara ini berlaku disebabkan berbagai faktor antaranya kerana kesukaran mendapatkan bekalan dan khidmat nasihat daripada ahli perubatan dan para medik serta kurangnya pendedahan dan ilmu pengetahuan mengenai amalan dan kepentingan merancang keluarga menggunakan kaedah yang telah terbukti keberkesanan dan keselamatannya secara saintifik. Sebahagian yang lain pula melakukannya disebabkan rasa tidak bersetuju dengan penggunaan kontraseptif moden kerana kontraseptif tersebut tidak memenuhi kehendak mereka. Ada yang memulaukannya berasaskan kesan sampingan yang dihasilkannya dan ada pula yang melihatnya sebagai sesuatu yang bertentangan dengan kepercayaan peribadi atau amalan tradisi mereka. Meningkatnya kehamilan yang tidak dirancang ditambah dengan masalah perubatan dan sosial berkaitan dengannya menjadikan usaha untuk menghasilkan kontraseptif baru yang diterima oleh masyarakat perlu diteruskan.

Amalan penjagaan kesihatan khusus selepas bersalin dan dalam tempoh berpantang (40-44 hari) oleh masyarakat tempatan seperti berpantang (mengelak dari makan dan melakukan perkara tertentu),urut, bertuku (memanaskan badan dengan batu

yang disalai di atas api), bersalai atau berdiang dan minum ubat periok (air rebusan herba) atau makjun selama dalam tempoh tersebut dan kadangkala diteruskan hingga berbulan-bulan lamanya dikatakan bertujuan untuk menjaga kesihatan disamping mengawal kesuburan dan menjaga susuk tubuh wanita agar kekal ramping.

Masyarakat Malaysia mempunyai beberapa kaedah merancang keluarga selain daripada yang dinyatakan di atas. Menurut Roziah Omar (1999) dalam satu kajian di Melaka, beliau mendapati masyarakat umum mengetahui beberapa cara mengawal kesuburan menurut kaedah tradisional, antaranya ialah dengan memakan nenas, minum tonik atau ubat singseh untuk melawaskan perjalanan haid, selain urut dan sengkak. Kaedah memasukkan benda tajam seperti daun lalang, daun buluh atau lidi kelapa walaupun jarang, masih diamalkan oleh ahli masyarakat. Hasil kajian tersebut jelas menunjukkan bahawa amalan mengatur kesuburan cara tradisional ('indigenous fertility regulation methods') kebanyakannya dilakukan apabila seseorang wanita tersebut mengalami kelewatan kedatangan haid. Temubual antara penulis dengan beberapa Bidan Tradisional Melayu (tidak diterbitkan ) mendapati mereka enggan berkongsi ilmu mengenai herba kontraseptif. Mereka berpendapat herba kontraseptif yang diamalkan oleh masyarakat terdahulu tidak begitu sesuai digunakan kerana ia boleh menyebabkan keguguran kandungan. Mereka lebih menggalakkan penggunaan kontraseptif moden dan dalam masa yang sama menggunakan herba atau rawatan tradisional untuk mengatasi beberapa masalah yang dihadapi akibat kesan sampingan pil kontraseptif seperti discaj yang berlebihan atau infeksi fungus seumpama kandida.

Amalan merancang keluarga dalam Masyarakat Orang Asli Kaum Temuan di Guntur, Negri Sembilan agak berlainan daripada yang dilaporkan. Temubual dengan En. Jantan bin Seman seorang bomoh dan Ketua Masyarakat Orang Asli Kaum Temuan di

Guntur Negri Sembilan menyatakan bahawa Masyarakat Orang Asli di sini mengelak daripada mengambil akar kayu perancang apabila wanita lewat kedatangan haid, sebaliknya mereka menggalakkan kaum wanita mereka mengamalkan pengambilan air rebusan campuran beberapa akar kayu secara berkala setiap bulan. Herba kontraseptif diminum setiap pagi selama tiga hingga lima hari sebelum tarikh jangkaan kedatangan haid. Ini bertujuan untuk mengelak seseorang wanita itu daripada disyaki atau disahkan hamil sebelum usaha merancang keluarga dengan meminum air rebusan akar kayu dilakukan. En. Jantan turut membekalkan herba perancang keluarga kepada Masyarakat Melayu setempat apabila mereka memerlukannya. Kebanyakan mereka yang datang untuk mendapatkan bekalan tersebut adalah merupakan wanita (atau diwakili suami) yang telah kelewatan haid tetapi tiada kepastian samada mereka telah mengalami kehamilan. En. Jantan biasanya menasihatkan mereka supaya berhenti mengambil herba tersebut sekiranya haid mereka terus tidak datang selepas pengambilan dilakukan selama lima hari berturut-turut.

Pengambilan herba perancang keluarga secara berterusan pernah diamalkan oleh masyarakat Orang Asli tetapi menurut En. Jantan kaedah tersebut adalah lebih rumit kerana ia memerlukan bekalan dan pengambilan herba yang berterusan dan kini ia jarang diamalkan. Memandangkan amalan merancang atau mengatur kesuburan cara tradisional masih mendapat tempat dalam masyarakat tempatan mahupun pada peringkat antarabangsa, adalah menjadi tanggungjawab kita untuk menyelidiki keberkesanan serta keselamatan kaedah merancang keluarga tersebut. Pertubuhan Kesihatan se Dunia (WHO) sangat menggalakkan kajian saintifik dijalankan terhadap kontraseptif tradisional. Terdapat suatu program khas bagi membangunkan kontraseptif yang dipanggil "Contraceptive Development Program of the International Committee for Contraceptive Research of the Population Council". Berbagai negara dan pertubuhan menyumbang



geran bagi menjalankan penyelidikan berkaitan samada di negara maju seperti Amerika atau negara yang sedang membangun seperti China, India dan Pakistan (Chaudhury, 1999; Wei-cheng, *et al.*, 1993; Chang, *et al.*, 1993a; Vanage, *et al.*, 1993 dan Kaplan-Kraicer, *et al.*, 1996).

Penyelidikan berkaitan herba kontraseptif masih terus berkembang seperti yang dilaporkan dalam banyak jurnal penyelidikan samada melibatkan kajian praklinikal, kontraseptif untuk kegunaan lelaki atau kajian klinikal (Gupta, *et al.*, 2004; Anand, *et al.*, 1991; Xiao & Wang, 1991; Geoffrey & Waites, 2003; Dhall & Dogra, 1988). Glossypol sejenis derivat biji kapas yang berasal daripada herba kontraseptif lelaki di Negara China telah menjalani kajian klinikal dan kini boleh didapati di pasaran. Glossypol memusnahkan sperma yang terdapat dalam tubul seminiferus tetapi tidak mendatangkan kesan mudarat pada fungsi endokrin testis (George, *et al.*, 2004).

Penglibatan penyelidik tempatan dalam mengkaji herba kontraseptif masyarakat negara ini amatlah terhad. Pada sekitar tahun 1980an sekumpulan penyelidik di Universiti Sains Malaysia (USM), Penang telah menjalankan kajian terhadap kesan herba kontraseptif *Goniothalamus macrophyllus* ("Selayak hitam") dan cuba menentukan mekanisme cara tindaknya. Mereka menemukan bahawa herba ini mempunyai kesan teratogenik (Gan, 1988). Kumpulan penyelidik daripada Universiti Kebangsaan Malaysia (UKM) pula memberi perhatian terhadap spesis *Goneothalamus tapis migo*. Goniotalamin, derivatif yang ditemui daripada tumbuhan ini mempunyai kesan antiprogesteron (Azimahtol, *et al.*, 1994) dan antiestrogen (Azimahtol, *et al.*, 1992, Azimahtol, *et al.*, 1995). Derivatif Styrylpyrone (SPD) kini giat diselidiki sebagai agen antibarah buah dada (Azimahtol & Stanslas, 1998; Meenakshii, *et al.*, 2000).

Kami tertarik dengan kaedah merancang keluarga yang diamalkan oleh masyarakat Orang Asli Kaum Temuan kerana ia mempunyai kaedah pengambilan air rebusan akar kayu (tumbuhan ubatan) yang teratur. Tambahan pula En. Jantan dan keluarga amat berminat berkongsi pengalaman mengenai penggunaan tumbuhan ubatan bagi tujuan penyelidikan. Beliau bersedia membekalkan sampel herba yang diperlukan. Sediaan herba kontraseptif ini terdiri daripada campuran tiga tumbuhan asas yang dinamai "Peluruh", "Pemecah darah" dan "Pengecut" oleh masyarakat Orang Asli di sini. Tumbuhan herba "Peluruh" dan "Pengecut" boleh diambil secara berasingan dengan meminum air rebusan setiap pagi.

Nama saintifik dan data mengenai autentikasi tumbuhan telah dikenalpati. Ekstrak herba campuran dan ekstrak masing-masing tumbuhan ubatan disediakan di makmal dan kajian telah dijalankan untuk mengetahui kesan ekstrak herba terhadap kehamilan, pusingan estrus dan ovulasi menggunakan tikus sebagai model kajian. Keputusan kajian menunjukkan spesis tumbuhan kontraseptif adalah *Lepidagatis longifolia* (P1), *Palaquium* sp (P2) dan *Phyllagathis rotundifolia* (P3). Tumbuhan ini dikenali sebagai "Peluruh" (P1), "Pemecah darah Cungkiau" (P2) dan "Pengecut" atau "Lindung malam" (P3) pada kalangan Masyarakat Orang Asli Kaum Temuan. Herba mudah dikenali melalui struktur morfologi dan ujian kromatografi lapisan nipis. Mengikut amalan tradisional, air rebusan campuran ketiga-tiga spesis tumbuhan diambil selama tiga hingga lima hari sebelum tarikh jangkaan haid. P1 dan P3 masing-masing pernah digunakan sebagai kontraseptif melalui pengambilan air rebusan secara berterusan.

Dalam kajian terdahulu, kami mendapati Dos E dan F EP123 (masing-masing 7.5 dan 10 kali dos yang diambil manusia) menurunkan berat badan dan menyebabkan resopsi total fetus apabila diberikan pada hari pertama (H1) hingga hari ke 10 kehamilan

(H10). Dos G (12.5 kali dos manusia) menghalang implantasi pada tikus. Pemberian Dos F EP123 pada peringkat pertengahan dan akhir kehamilan menyebabkan kematian fetus sebelum atau selepas dilahirkan, pemanjangan tempoh kehamilan, kegagalan pembukaan servik dan kematian ibu. Tiada terdapat kesan teratogenik pada fetus yang ibunya dirawat dengan EP123. Ekstrak ini (EP123) paling berkesan menyebabkan resopsi fetus pada peringkat awal dan separuh masa kedua kehamilan diikuti EP3, EP1 dan EP2. Semua fetus mengalami resopsi penuh apabila ibu dirawat dengan EP123 pada peringkat awal (separuh masa pertama) kehamilan. Berat badan fetus dan uri tikus yang dirawat dengan EP123 pada separuh masa kedua kehamilan adalah rendah dan berbeza dengan signifikan berbanding Kumpulan kawalan. Berat fetus tikus yang menerima masing-masing ekstrak herba (EP1, EP2 dan EP3) pada separuh masa pertama dan kedua kehamilan tidak berbeza dengan signifikan berbanding Kumpulan kawalan. Terdapat petunjuk bahawa berat uri tikus ini tinggi berbanding Kumpulan kawalan walaupun sesetengahnya tidak menunjukkan berbezaan yang signifikan. Kepekatan hormon estradiol dan progesteron tikus hamil-pseudo yang dirawat dengan EP123 menurun dengan signifikan berbanding Kumpulan kawalan (masing-masing  $p < 0.01$  dan  $p < 0.05$ , M-WU). Ini disertai inhibisi pembentukan desidua endometrium. Ekstrak P1, P2 dan P3 menyebabkan penurunan kepekatan estradiol dan progesteron serta inhibisi desidualisasi tetapi masing-masing tidak berbeza dengan signifikan berbanding Kumpulan kawalan ( $p > 0.05$ , M-WU).

Pusingan estrus tikus menjadi panjang dan tanpa ovulasi (anestrus) apabila tikus dirawat dengan Dos F EP123 manakala kepekatan estradiol, progesteron, FSH dan LH menurun dengan signifikan ( $p < 0.01$ , KW) berbanding Kumpulan kawalan. EP123 paling poten menurunkan kepekatan estradiol dan progesteron serta memanjangkan pusingan estrus, ini diikuti EP1 dan EP2. Ekstrak P3 menyebabkan penurunan kepekatan estradiol ( $p < 0.001$ , M-WU) tetapi meningkatkan kepekatan progesteron dengan signifikan ( $p < 0.001$ ,

M-WU). Nisbah estradiol : progesteron tikus yang diberi ekstrak berubah berbanding Kumpulan kawalan dan menyerupai keadaan hamil-pseudo. Pemeriksaan histologi ovari menunjukkan kehadiran kopora lutea dan ova yang mengalami atresia pada semua tikus yang dirawat dengan ekstrak dan kopora lutea paling banyak dikesan pada tikus yang menerima EP3. Nisbah ketebalan lapisan endometrium : otot uterus meningkat pada tikus yang dirawat dengan ekstrak juga maksimum pada tikus yang menerima EP3. Penemuan ini menyokong keadaan hamil-pseudo yang dicetuskan oleh ekstrak herba kontraseptif. Pusingan estrus tikus boleh berbalik selepas pemberian ekstrak diberhentikan walaubagaimanapun, ia mengambil masa yang agak lama terutama selepas pemberian EP123 dan EP1. Pemberian eCG merangsang ovulasi pada sebahagian tikus dan pemberian eCG diikuti hCG menyebabkan ovulasi pada semua tikus yang dirawat dengan EP123.

Dalam kajian ini pewarnaan immunohistokimia kelenjar pituitari anterior dilakukan bagi memahami dengan lebih lanjut kesan herba terhadap sistem reproduktif. Adalah diharapkan apabila penyelidikan ini selesai dijalankan maklumat mengenai keberkesanan dan mekanisme cara tindak herba tradisional ini dapat dikemukakan dan cadangan dapat diberikan samada formulasi ini sesuai untuk dibangunkan sebagai herba kontraseptif atau sebaliknya.

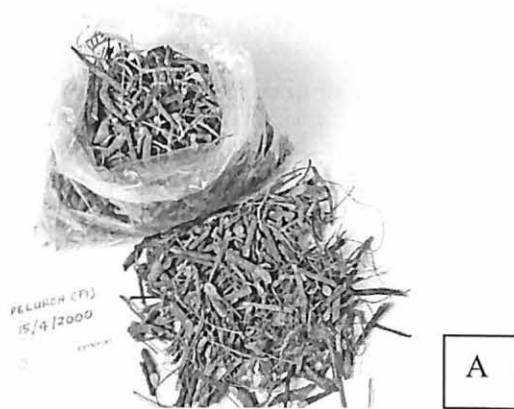
## 2. BAHAN DAN KAEDAH

### 2.1 HERBA KONTRASEPTIF

#### 2.1.1 TUMBUHAN UBATAN

Bahan mentah herba dibekalkan oleh En. Jantan bin Seman yang menetap di Kampung Guntur, Padang Lebar, 72200 Batu Kikir, Negri Sembilan. Apabila bekalan tumbuhan ubatan diperlukan beliau bersama rakan atau ahli keluarga akan ke hutan di Kawasan Daerah Jempol atau Jelevu, Negri Sembilan untuk mendapatkan sampel yang diperlukan. Bekalan tumbuhan ubatan diperolehi setiap 3 ke 6 bulan disepanjang tahun antara April 1996 hingga Jun 2003. En Jantan selalunya mengunjungi hutan di dua daerah tersebut dalam ketinggian anggaran 100 hingga 500 kaki daripada paras laut. Apabila ditemui, pokok yang sesuai saizya (umurnya) akan dicabut. Batang dan akar yang merupakan bahan yang digunakan dalam kajian ini dibawa pulang. Bahagian tumbuhan ini dibersihkan sebelum dipotong dan dijemur bawah cahaya matahari hingga kering (3 hingga 5 hari)

Sampel yang telah kering dilabel dan dibawa ke Makmal Farmakologi, Pusat Pengajian Sains Perubatan, USM Kampus Kesihatan, Kelantan, melalui perkhidmatan pos laju atau dibawa dengan kenderaan persendirian. Gambar 1 menunjukkan tumbuhan ubatan P1, P2 dan P3 yang dibekalkan oleh En. Jantan bin Seman. Rupa fizikal ketiga-tiga sampel tumbuhan ini amat mudah dikenali dan dibezakan antara satu sama lain. Maklumat lanjut mengenai tumbuhan ubatan yang dikaji boleh didapati dalam tesis PhD tulisan Siti Amrah Sulaiman yang bertajuk Kajian mengenai profail kontraseptif sediaan herba tradisional orang asli Kaum Temuan.



Gambar 1. Tumbuhan ubatan yang dibekalkan oleh En. Jantan bin Seman yang telah dikeringkan. A: Peluroh (P1), B: Pemecah darah chungkiau (P2) dan C: Pengecut (P3). Tumbuhan ubatan yang belum dikisar mudah dicamkan.

### 2.1.2 PENGERINGAN DAN PENSTORAN

Setibanya di Makmal Jabatan Farmakologi, Pusat Pengajian Sains Perubatan, Kampus Kesihatan, USM, sampel diperiksa dari segi label, bentuk fizikal dan kualitinya. Sampel yang mengalami infeksi kulat dan kerosakan diasingkan dan tidak digunakan untuk tujuan penyelidikan. Kesemua sampel yang terpilih dibasuh bersih menggunakan air paip dan dibilas dengan air suling sebelum dikeringkan pada suhu 40-42°C sehingga betul-betul kering (berat sampel tidak berubah sebanyak 3 kali timbangan berturut-turut). Tempoh pengeringan adalah antara 3-5 hari bergantung kepada spesis dan tahap pengeringan terdahulu (jemuran matahari). Sampel kering dipek dalam plastik, dilabel dan disimpan di dalam bilik sejuk pada suhu 4-8°C sehingga digunakan. Sampel dikisar dalam saiz 250 $\mu$  untuk tujuan ekstraksi.

### 2.1.3 PENYEDIAAN EKSTRAK UNTUK PENYELIDIKAN

#### 2.1.3.1 EKSTRAKSI HERBA CAMPURAN (EP123)

Ekstrak herba campuran dan ekstrak setiap spesis tumbuhan diperolehi dengan melakukan sendiri proses ekstraksi di Makmal Jabatan Farmakologi, Pusat Pengajian Sains Perubatan. Serbuk herba kering diekstrak dengan peralatan Soxhlet menggunakan air suling sebagai pelarut. Ekstrak herba campuran (EP123) disediakan dengan melakukan ekstraksi serbuk kering ketiga-tiga herba P1, P2 dan P3 masing-masing dengan nisbah berat 1.7:6:4 mengikut berat dan dicampurkan bersama. Campuran dimasukkan ke dalam timber peralatan Soxhlex menggunakan air sebagai pelarut (Rajah 1).

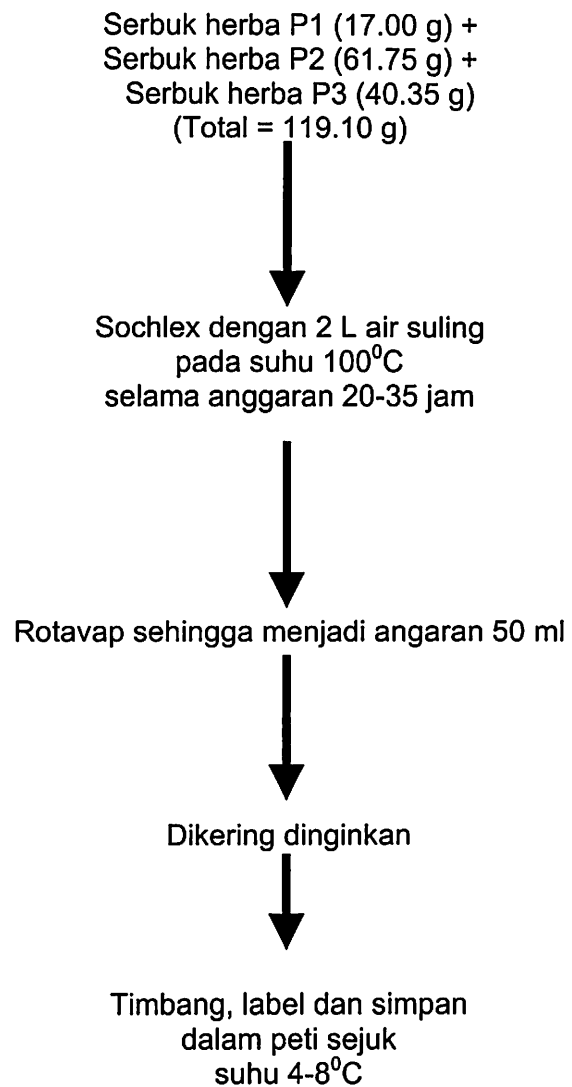
Nisbah berat ketiga-tiga tumbuhan diperolehi berasaskan formula yang diberikan oleh En. Jantan bin Seman (lihat bahagian 3.3). Air suling (2 L) dididihkan pada suhu 100°C dan proses ekstraksi terhadap campuran P1, P2 dan P3 masing-masing sebanyak

17.00 g, 61.75 g dan 40.35 g dilakukan selama anggaran 20-35 jam, sehingga air larutan ekstraksi hampir jernih. Cairan ekstrak dituras dan dipekatkan menggunakan pemeluap berpusing ('rotavaporizer') sehingga isi padu menjadi kira-kira 50 ml. Hasil ekstrak pekat dimasukkan ke dalam beberapa botol universal dan disejukkan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$ . Ia seterusnya dikering dinginkan ('freezed dried'). Hasil yang diperolehi ditimbang, dilabel dan disimpan dalam peti sejuk suhu  $4-8^{\circ}\text{C}$  sehingga digunakan untuk kajian.

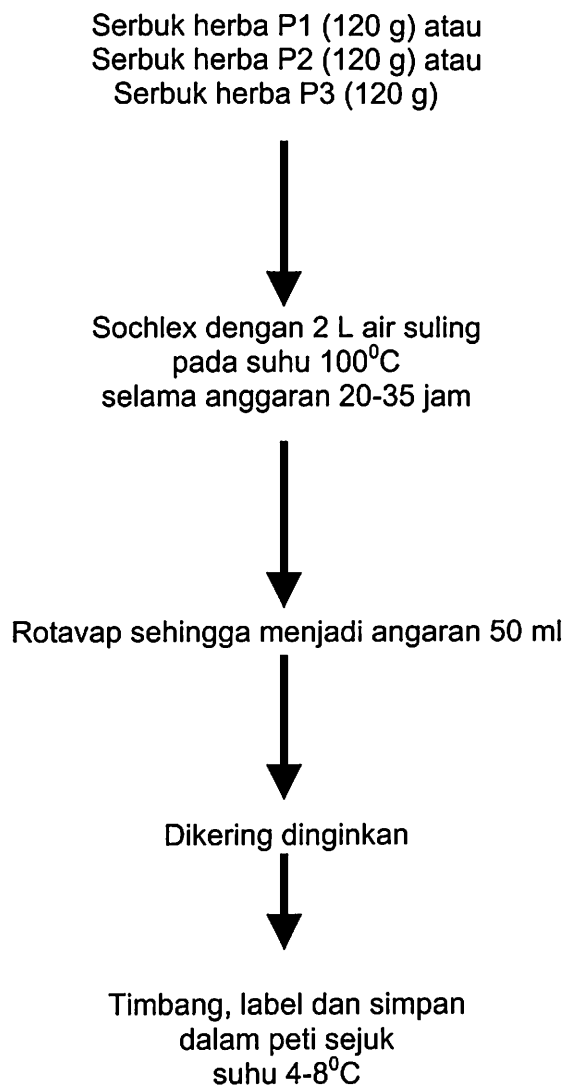
#### 2.1.3.2 EKSTRAKSI MASING-MASING TUMBUHAN HERBA (EP1, EP2 DAN EP3).

Ekstrak masing-masing spesis tumbuhan (EP1, EP2 dan EP3) diperolehi dengan mengekstrak serbuk kering setiap tumbuhan secara berasingan sebanyak 120 g dengan 2 L air suling. Kaedah ekstraksi adalah menggunakan peralatan Soxhlet dan kering dingin sama seperti langkah penyediaan ekstrak herba campuran. Carta alir proses ekstraksi herba P1, P2 dan P3 adalah seperti di dalam Rajah 2.





Rajah 1 Carta alir penyediaan ekstrak herba campuran (EP123).



Rajah 2 Carta alir penyediaan masing-masing ekstrak herba (EP1, EP2 dan EP3).

#### 2.1.4 KUALITI EKSTRAK

Kualiti dan keserataan ekstrak dijamin melalui beberapa prosidur yang dilakukan. Bekalan bahan mentah herba dipastikan perolehannya daripada satu sumber sahaja, iaitu melalui En. Jantan bin Seman. Dalam hal ini telah dipersetujui bahawa umur tumbuhan yang gunakan adalah hampir sebaya bagi setiap spesis dan ia diperolehi dari dua kawasan perhutanan iaitu Jelevu dan Jempul. Pengeringan herba dilakukan menurut langkah yang serupa sepanjang masa. Autentikasi setiap sampel tumbuhan dilakukan di makmal menurut tatacara yang dinyatakan di Lampiran 1. Sampel yang tidak memenuhi ciri-ciri autentikasi masing-masing tumbuhan akan ditolak. Proses ekstraksi dilakukan menurut prosidur yang disebutkan di atas dan dilakukan oleh personal yang sama setiap kali ia dijalankan. Ekstrak dikeringkan ('lyophilised') dan disimpan dalam peti sejuk (suhu 4-8°C) sehingga digunakan dan dipastikan tidak melebihi tempoh tiga bulan dari tarikh disediakan.

#### 2.1.5 PENYEDIAAN DAN PIAWAIAN DOS UNTUK KAJIAN

##### 2.1.5.1 KAJIAN PRELEMINARI PIAWAIAN

Sebelum memulakan kajian, penentuan dos yang diambil oleh manusia telah dilakukan. En. Jantan telah diminta melakukan demonstrasi preskripsi yang diberikan oleh beliau kepada anak perempuannya yang mempunyai berat badan anggaran 50 kg. Berat sebenar dan nisbah masing-masing herba ditentukan. Berat yang diperolehi ialah 6.79 g bagi P1, 24.71 g bagi P2 dan 16.13 g bagi P3 yang memberikan nisbah anggaran 1.7:6:4. Campuran ketiga-tiga herba ini kemudiannya direbus menggunakan 3 gelas air (450 ml X 3) selama kira-kira 3 jam dengan api sederhana sehingga menjadi isipadu anggaran satu gelas (450 ml). Larutan air rebusan herba ini kemudiannya ditapis, dikeringkan menggunakan pemeluap berputar hingga menjadi kira-kira 30 ml. Cairan pekat ini kemudiannya dikering-dinginkan dan berat ekstrak kering yang diperolehi ditimbang.

Ekstrak herba campuran (EP123) yang diperolehi dengan cara ini ialah sebanyak 2.70 g dan ia dijadikan sebagai rujukan dan garis panduan bagi mengira dos EP123 yang diambil oleh manusia ia itu 2.70 gm bagi 50 kg wanita menjadikan dos herba kontraseptif EP123 sebanyak 54 mg/kg berat badan.

Berasaskan dos yang digunakan pada manusia, sediaan dos ekstrak herba campuran, EP123 dilakukan dalam tujuh dos yang berbeza dan di kenali sebagai Dos A, B, C, D, E, F dan G. Dos A mengandungi pelarut sahaja iaitu air suling ('vehical') disediakan untuk merawat tikus kawalan atau kumpulan kawalan. Amaun Dos B, C, D dan E masing-masing adalah 1X, 2.5X, 5X, 7.5X, 10X dan 12.5 X dos manusia. Isipadu ekstrak yang digunakan untuk dalam kajian ini ditetapkan sebanyak 0.2 ml. Dos-dos ini digunakan untuk menjalankan Kajian kesan ekstrak terhadap kehamilan 10 hari pertama pada tikus. Hasil kajian mendapati kedua-dua dos 7.5X dan 10X dos manusia menyebabkan 100% resorpsi fetus. Dos 10X juga menyebabkan tikus mengalami penurunan berat badan antara 5 hingga 10% daripada berat badan asal, manakala dos 7.5X menyebabkan penurunan berat badan antara 0 hingga 5%. Dos 10X (Dos F) dipilih sebagai dos yang mempunyai kekuatan 100% ia itu dos yang menyebabkan resorpsi fetus 100% apabila suntikan ekstrak diberi setiap hari selama 10 hari berturut-turut mulai H1 hingga H10 dan purata berat badan tikus menurun antara 5-10% daripada berat badan asal tikus. Ekstrak yang disediakan selepas ekstrak pertama ini dipiawaikan dengan mengenalpastikan Dos F.

#### 2.1.5.2 KAEDAH PIAWAIAN EP123

Piawaian terhadap EP123 dilakukan melalui piawaian biologi. Sebanyak 9 ekor tikus hamil (berat badan 190-200 g pada H1) dibahagikan kepada 3 kumpulan ( $\alpha$ ,  $\beta$  dan  $\gamma$ ) dan diberi suntikan EP123 masing-masing sebanyak 270, 405 dan 540 mg/kg/hari selama

10 hari berturut-turut mulai H1 hingga H10. Sebanyak tiga ekor tikus digunakan dalam setiap kumpulan dan cuma 3 dos dipilih. Berat badan tikus ditimbang di awal dan akhir kajian dan keadaan klinikalnya diperhatikan. Tikus dikorbankan pada H16 dan laparotomi dilakukan. Uterus dikeluarkan, keadaan kehamilan dikenalpasti dengan membuat hirisan memanjang pada uterus. Uterus yang tiada menunjukkan ciri-ciri kehamilan direndam dalam larutan 10% ammonium sulfat untuk mengesan tapak-tapak implantasi. Dos yang menyebabkan resorpsi fetus 100% dan penurunan berat badan ibu antara 5-10% ditetapkan sebagai Dos F.

Apabila amaun Dos F telah dapat dikenal pasti, dos-dos lain akan ditentukan dengan mengira beratnya berbanding Dos F. Isipadu dos yang disediakan ditetapkan sebanyak 0.2 ml setiap satu kecuali dos G yang disediakan dalam 0.3 ml, bagi mengelakkan sediaan ekstrak yang terlalu pekat. Ekstrak dimasukkan ke dalam tiub-tiub kecil ('aliquat'), ilabel dan sedia digunakan untuk kajian. Apabila dos-dos ini diberikan kepada tikus yang berat badannya anggaran 200 g, maka ia akan memberikan nilai 54, 135, 270, 405, 540 dan 675 mg/kg berat badan. Sekiranya ia tidak digunakan pada hari yang sama, tiub-tiub kecil mengandungi ekstrak yang telah dilabel, disimpan di dalam peti sejuk pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  sehingga diperlukan. Ekstrak beku dikeluarkan daripada peti sejuk, dibiarkan cair dan dipastikan berada pada suhu bilik sebelum diberi kepada haiwan kajian. Berdasarkan kajian yang telah dijalankan nilai Dos F EP123 adalah antara 270 mg/kg dan 540 mg/kg.

#### 2.1.6 PEMILIHAN KAEDAH ADMINISTRASI EKSTRAK

Dua kaedah pemberian rawatan telah diujikan. Kaedah 'gavaging' mudah dilakukan tetapi tikus didapati mengalami ceret dan mengeluarkan najis hijau cair apabila dos 270 mg/kg dan ke atas diberikan. Kaedah kedua ialah dengan memberikan suntikan

subkutis. Kaedah ini juga mudah dilakukan dengan menyuntik ekstrak pada bahagian tengkuk atau belakang tikus. Tiada kesan sampingan diperhatikan kecuali sedikit pembengkakan di kawasan suntikan selepas 24 jam pemberian dos pertama. Kesan pembengkakan tersebut didapati hilang selepas suntikan kedua diberikan. Berasaskan kepada pemerhatian ini, kaedah pemberian secara subkutis telah dipilih sebagai kaedah administrasi ekstrak herba kepada semua tikus kajian.

#### 2.1.7 PENYEDIAAN DOS EP1, EP2 DAN EP3 DALAM KAJIAN PERBANDINGAN ANTARA EKSTRAK

Dos EP123, EP1, EP2 dan EP3 bagi tujuan kajian perbandingan disediakan dalam satu kepekatan sahaja berasaskan amaun Dos F EP123. Kepekatan Dos EP1, EP2 dan EP3 disediakan sama dengan EP123. Herba yang digunakan dipastikan dibekalkan pada masa yang sama bagi mengelak kelainan atau perbezaan sumber. Larutan ekstrak ini dimasukkan ke dalam tiub kecil sebanyak 0.2 ml sama seperti langkah yang dilakukan bagi ekstrak herba campuran. Semua ekstrak yang tersedia disimpan di dalam peti sejuk suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  sehingga digunakan untuk kajian (tidak melebihi 3 bulan daripada tempoh ia disediakan).

### 2.2 HAIWAN KAJIAN

#### 2.2.1 Bekalan haiwan kajian

Haiwan kajian yang digunakan adalah tikus putih *Rattus norvegicus*, jenis Sprague Dowley yang dibiak sendiri di Unit Rumah Haiwan, USM, Kampus Kesihatan. Baka haiwan diperolehi sebelum ini daripada Institut Penyelidikan Perubatan (IMR), Kuala Lumpur oleh pihak pengurusan. Haiwan kajian diletakkan di dalam sangkar poliprolin dan dipelihara pada suhu bilik  $20\pm 2^{\circ}\text{C}$  dengan pencahayaan 12 jam cerah dan 12 jam gelap.

Makanan seimbang tikus makmal ('laboratory mouse pallet') dan minuman air paip yang mencukupi ('ad libitum') sentiasa dibekalkan kepada semua tikus. Penjagaan dan tatacara menjalankan kajian terhadap tikus dilakukan mengikut peraturan yang telah ditetapkan oleh pihak Jawatankuasa Penyelidikan Universiti, seperti yang tertera di dalam garispanduan Jawatankuasa Etika Haiwan bagi penyelidikan menggunakan haiwan di Universiti Sains Malaysia. Kertas kerja cadangan penyelidikan telah diluluskan oleh Jawatankuasa Penyelidikan dan Etika Pusat Pengajian Sains Perubatan dan dibiayai sepenuhnya melalui Geran Penyelidikan Jangka Pendek Universiti Sains Malaysia, Projek No. 304/PPSP/6131266.

#### 2.2.2 Kemampuan reproduktif baka haiwan kajian

Kemampuan reproduktif tikus dipersekitaran tempat penyelidikan dijalankan telah dinilai terlebih dahulu sebelum kajian dimulaka. Hasil kajian menunjukkan baka haiwan yang digunakan mempunyai kemampuan reproduktif yang tinggi dan sesuai digunakan bagi kajian reproduktif.

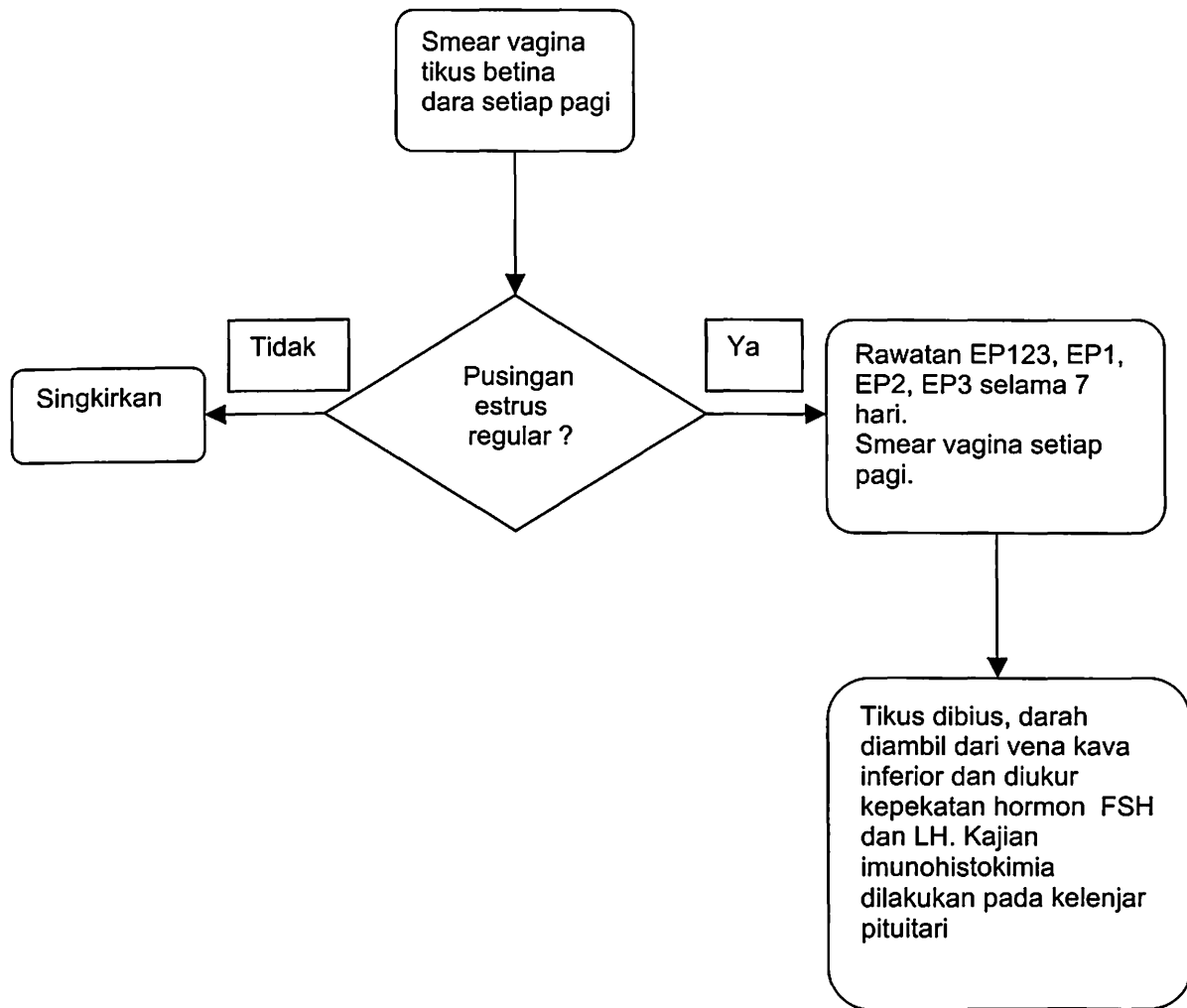
### 2.3 TATACARA PENYELIDIKAN

#### 2.3.1 REKABENTUK KAJIAN

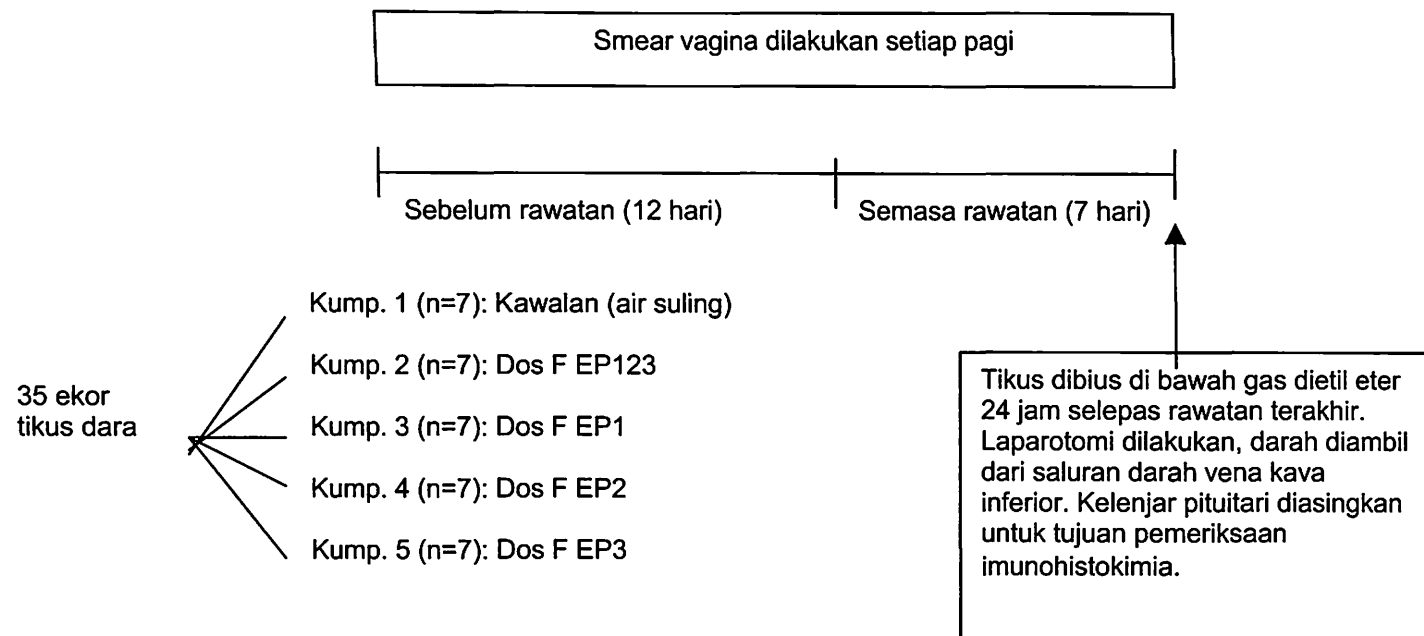
Tiga puluh lima (35) ekor tikus betina dara dengan pusingan estrus regular 4 hari dalam dua pusingan berturut-turut dibahagi kepada 5 kumpulan (Kumpulan 1 hingga 5), 7 ekor setiap kumpulan (Rajah 3 dan 4). Kumpulan 1 dijadikan kawalan (suntikan air suling 0.2 ml/hari selama 7 hari berturut-turut). Tikus Kumpulan 2 diberi suntikan Dos F EP123, Kumpulan 3, 4 dan 5 masing-masing diberi EP1, EP2 dan EP3 dalam dos yang sama beratnya dengan Dos F EP123 selama 7 hari mulai hari kedua pusingan estrus. Berat badan dicatatkan pada H1 dan H8. Keadaan klinikal dan smear vagina dicatatkan setiap

pagi. Tikus dibius dengan gas dietil eter pada hari ke 8 iaitu 24 jam selepas rawatan terakhir, laparotomi dilakukan dan darah daripada saluran vena kava inferior dikumpulkan sebanyak anggaran 5 mL. Tikus dibunuh ketika dibius dengan memotong saluran darah utama. Semasa tikus dikorbankan smear vagina dipastikan berada pada fasa diestrus. Rawatan akan diteruskan sehingga smear vagina menunjukkan diestrus. Kepala tikus dipotong dibahagian leher dan bahagian hadapan (muka) lalu direndam dalam larutan 10% formalin dalam salina normal. Kelenjar pituitari dikeluarkan selepas satu minggu bagi tujuan kajian imunohistokimia. Darah diempar pada 3000 rpm selama kira-kira 10 min. Serum disimpan dalam beberapa tiub kecil pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  sehingga analisis FSH dan LH menggunakan kit RIA dijalankan.





Rajah 3 Carta alir kajian perbandingan kesan pemberian EP123, EP1, EP2 dan EP3 terhadap gonadotrof kelenjar pituitari (kajian imunohistokimia) serta kepekatan FSH dan LH tikus.



Rajah 4.

Reka bentuk kajian perbandingan kesan pemberian EP123, EP1, EP2 dan EP3 terhadap gonadotrof kelenjar pituitari (kajian imunohistokimia) serta kepekatan FSH dan LH tikus.

Tiga puluh lima (35) ekor tikus dara yang mempunyai pusingan estrus regular 4 hari dalam dua pusingan berturut-berturut di bahagi kepada 5 kumpulan. Tikus Kumpulan 2 diberi suntikan Dos F EP123 (antara jam 0830-1030) selama 7 hari berturut-turut mulai H2 pusingan estrus. Tikus Kumpulan 3, 4 dan 5 masing-masing diberi EP1, EP2 dan EP3 yang sama beratnya dengan dos EP123. Tikus Kumpulan 1 (kawalan) diberi suntikan air suling 0.2 ml/hari. Semua tikus dikorbankan 24 jam selepas rawatan terakhir semasa smear vagina diestrus. Keadaan fizikal tikus diperhatikan setiap pagi.

## 2.3.2 ANALISIS HORMON

### 2.3.2.1 Analisis kepekatan FSH

Kits RIA dan tiub bersalut anti-FSH antibodi dibekalkan oleh BIOCOTE S.A. rue E. Solvay, 101-103 4000 Liege, Belgium, khusus untuk pengukuran kepekatan FSH dalam serum atau plasma tikus. Kaedah analisis dijalankan mengikut garis panduan yang diperturunkan dalam tatacara manual.

- i. Kesemua bahan dibiarkan mencapai suhu bilik (20-28°C) sebelum digunakan.
- ii. Tiub dilabel berganda untuk "bacaan total" [T], piawaian (kalibrator), kawalan dan sampel serum tikus kajian.
- iii. **Piawaian (kalibrator):** Sebanyak 100 µl setiap piawaian (kalibrator) FSH berbagai kepekatan (Jadual 1) dimasukkan ke dalam masing-masing tiub bersalut yang telah dilabel.
- iv. **Kawalan dan sampel:** Sebanyak 100 µl kawalan dan masing-masing sampel kajian dimasukkan ke dalam tiub berganda.
- v. Sebanyak 50 µl MAb <sup>125</sup>I ditambah ke dalam semua tiub. Tiub digoncang dengan hati-hati. Tiub T diasingkan bagi pengiraan pada langkah x dan tidak terlibat dalam tatacara berikut.
- vi. Semua tiub dieramkan pada suhu bilik (20-30°C) selama 90 min di atas alat penggoncang orbital (pada 340 rpm).
- vii. Larutan di dalam tiub dituang dan tiub-tiub ditunggungkan di atas kertas kedap beberapa minit.
- viii. Sebanyak 2 ml larutan pencuci ditambah ke dalam setiap tiub. Selepas 1 minit larutan pencuci dituangkan dan tiub ditungging di atas kertas kedap selama beberapa minit.
- ix. Ulang cucian seperti langkah viii.